

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 19 MAY 2004

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 14 965.1

Anmeldetag: 02. April 2003

Anmelder/Inhaber: Dr. Dr. Larissa Vasilets,
06179 Teutschenthal/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zum qualitativen Nach-
weis von posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten

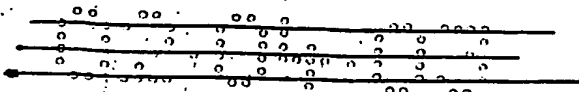
IPC: C 12 Q 1/48

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. April 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust



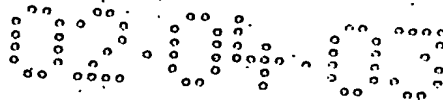
Verfahren und Vorrichtung zum qualitativen Nachweis von posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum qualitativen Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten, in einer kleinen flüssigen Probe aus den Zellen, des Organismus oder mit Test Chemikalien. Die vorliegende Erfindung bietet ein Sensor, der einen engineeren Polypeptid darstellt und ein „Recognition Site“ für posttranslationale Modifizierung, und eine Reihe geladener Aminosäure Reste enthält. Durch unsymmetrische Ladungsverteilung besitzt der Sensor Dipol-Eigenschaften. Modifizierung des Polypeptides durch posttranslationale Aktivität in der Probe führt zu Veränderungen der molekularen elektrostatischen Potentiale und als Folge Veränderungen der Ladungsverteilung und der Dipoleigenschaften des Sensors, die mit Hilfe von elektrischen oder optischen Messungen detektiert sein können. Die Erfindung stellt ein schnelles, hochsensibles und effizientes Verfahren zum Nachweis der verschiedenen Typen der posttranslationalen Aktivitäten dar, daß besonders im Bereich der biologischen Multidetektionssysteme (Bio-Chips oder „high throughput screening“) geeignet ist. Anwendung des Sensors in Multidetektionssysteme ermöglicht eine Automatisierung des Verfahrens in der Pharmaka Forschung- und Entwicklung, Biologie, Umwelttechnologie und molekularer Diagnostik.

Einleitung

W Systeme und Methoden zum schnellen Nachweis von Analyten mit biologischen Aktivitäten, insbesondere in kleinen flüssigen Proben, haben eine hohe medizinische, pharmazeutische und agrochemische Bedeutung. Einer der umfassendsten und bedeutensten Gruppen der zellulären Aktivitäten, die für Pharmaka- Entwicklung besonders wichtig sind, sind die Aktivitäten, die in der posttranslationalen Modifizierung wirken. Als Folge dieser Aktivitäten, die für jede lebende Zelle charakteristisch ist, sind die veränderten funktionellen Eigenschaften der modifizierten Eiweise (Proteine). Die Hauptmechanismen von posttranslationalen Modifizierung der Proteine oder Polypeptiden, sind Phosphorilierung, Metilierung, Prenilierung, Ubiquitinierung und Proteolyse. Verschiedene externe Bedingungen (Stimuli) wie Anwesenheit von



Wachstumsfaktoren oder Hormonen oder Entwicklung von pathologischen Zuständen, wie Veränderungen in Zellzyklus und Wirkung von Toxinen, können vorübergehend den posttranslationalen Zustand mehrerer intrazellulärer Komponenten verändern. Deshalb ist die schnelle Entwicklung von spezifischen und effektiven Hemmern oder Aktivatoren von bestimmten posttranslationalen Aktivitäten notwendig. Insofern ist die Entwicklung von entsprechenden Proben und Verfahren wichtig, die einen zuverlässigen und empfindlichen Nachweis dieser Aktivitäten in Multidetektionssystemen ermöglichen.

Als Beispiel einer der posttranslationalen Modifizierung dient die Phosphorylierung-Dephosphorylierung der Proteine durch Kinasen und Phosphatasen. Die Kinasen modifizieren die Proteine durch Bindung einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung) zu Aminosäure Reste, überwiegend Serin, Threonin oder Tyrosin. Im Gegensatz dazu, entfernen Protein Phosphatasen, diese Phosphatgruppen, damit kehren sie den Phosphorylierungseffekt um. Die Veränderungen im Phosphorylierungszustand der Proteine regulieren enzymatische Aktivitäten, Lokalisierung und molekulare Wechselwirkungen zwischen Proteine in den lebenden Zellen. Die allgemeine Balance von Kinasen- und Phosphatasen-Aktivitäten in einer Zelle ist Grundlage des Proteinphosphorylierungszustandes zu jedem Zeitpunkt. Die Wirkung von Protein Kinasen und Phosphatasen ist allgemein betrachtet zu den wichtigsten regulatorischen Mechanismen der Protein-Funktionen. Die neusten Erkenntnisse und Analysen von Krankheiten, die auf genetischen Defekten von Protein Kinasen hinweisen, deuten auf über 400 spezifische Krankheitszustände hin, die mit veränderten Aktivitäten der Kinasen selbst in Verbindung zu sehen sind.

Stand der Technik

Leider verfügen die Methoden zum Nachweis der Kinasen und Phosphatasen Aktivitäten, die zur heutigen Zeit bekannt sind, erhebliche Nachteile. Das begrenzt die Möglichkeiten von schnellen Nachweisen dieser Aktivitäten in miniaturisierten Volumen und Tausenden von Komponenten.

Die aktuellen Nachweis- Methoden von Kinasen- Aktivitäten basieren typischerweise auf Messungen durch Einbau (Inkorporation) des radioaktiven Phosphats ^{32}P in Proteinsubstraten. Bei Anwendung dieser Methode für die gesamten Zellen, muß man sehr hohen Mengen von Radioaktivität verwenden um den gesamten intrazellulären Pool von ATP zu markieren und die Radioaktivitätsmarkierung des Zielproteins zu sichern. Um relative Phosphorylierung des Zielproteins nachzuweisen, müssen nach der Inkubierung von Zellen mit Testsubstanzen,

die Zellen lysiert (zerlegt) und das Zielprotein gereinigt werden. Diese Methode benötigt große Menge von Zellen, langen Inkubierungszeiten, vorsichtige Behandlungsverfahren um falsche Phosphorylierungs-Dephosphorylierung Ereignisse zu vermeiden. Außerdem benötigt ein solches Verfahren Reinigung des Zielproteins. Da die Endphosphorylierung des Zielproteins sehr niedrig sein kann, hat dieses Verfahren einen schlechten Wirkungsgrad. Besonders schwerwiegend für Umwelt und Gesundheit ist der hohe Verbrauch von Radioaktivität die diese Methode in den „high-throughput“ screening Versuchen notwendig macht.

Alternative Methoden zu Bestimmung von Kinasen Aktivitäten sind solche, die auf phosphorylierung-spezifischen Antikörpern basieren wie ELISA und Western Blots. Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß es schwierig und sehr kostenintensiv ist die Antikörper zu produzieren, die zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand des Proteins unterscheiden.

Aus dem Patent US 6,410,255 ist eine Methode bekannt, die Kinase Aktivität nachzuweisen ermöglicht. Es betrifft einen Sensor, der eine fluoreszent Gruppe, die in einem Polypeptid zusammen mit kinase-spezifischen Abschnitt und Protease-empfindlichen Abschnitt eingebaut ist. Die Modifizierung der Proteine führt zu veränderter Zugänglichkeit der Spaltungstelle zu Proteasen und Abspaltung der fluoreszierten Gruppe. Diese wird mit Hilfe von einem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Zusätzlich zu Kinasen, benötigt das Verfahren die Anwesenheit von Proteasen, zwischen deren eine Wechselwirkung möglicherweise zu Artefakten führen kann. Nachteilig sind die hohen Kosten von Fluoreszenzmikroskopen und die Notwendigkeit einer Fluoreszenzmarkierung des Zielpeptides.

Es ist ein Erfordernis ein Verfahren zur Bestimmung postrationalen Aktivitäten zur Anwendung zu bringen, welches hochsensibel und unkompliziert funktioniert, virtuell für jede Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten und für „high-throughput screening“ Methoden anwendbar ist. Notwendig sind Verfahren, die keine Farbstoffe, keine fluoreszierende oder radioaktive Substanzen beinhalten. Die vorliegende Erfindung stellt ein solches Verfahren dar. Weitere Vorteile sind enormes Einsparpotential an Kosten und Zeit, keine schweren Manipulationen oder Markierungen.

Die vorliegende Erfindung bietet somit ein Verfahren das insbesondere für biologische Multidetektionssysteme (Bio-Chip) geeignet ist.

Beschreibung der Erfindung

Der neu-entwickelte Sensor stellt ein engineernten Design-Polypeptid dar, der ein „Recognition Site“ für Protein Kinasen oder andere Enzyme der postrationalen Aktivitäten enthält.

Abbildung 1A zeigt die schematische Darstellung eines solchen Sensors. Der „Recognition Site“ mit einer oder mehreren Zielresten X befindet sich zwischen zwei Gruppen der Aminosäurereste (Moiety 1 und Moiety 2), die die Anzahl von aminosäure Resten 0 bis N haben und eine Reihe von geladenen Resten besitzen. Die Moietys 1 und 2 zusammen mit dem Recognition Sites sind nach solcher Art und Weise designed, so dass sie zu einer 3-dimensionalen (3-D) Struktur- mit spezifischer Verteilung des molekularen elektrostatischen Potentials führen. Somit besitzt der Sensor einen molekularen Dipolmoment μ (Abbildung 1B). Als Folge der o.g. posttranslationalen Aktivitäten, wird ein Zielreste X innerhalb des Recognition Sites in X* umgewandelt. Somit werden die elektrostatische Potentialsverteilung und Dipolmoment des Sensors μ^* verändert (Abb. 1B). Diese Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Sensors werden mit Hilfe elektrischer oder optischer Methoden (siehe unten) nachgewiesen. In einer Variante (embodiment) der Erfindung kann der Sensor mit Hilfe eines Linkers 3 an einem Festkörper, 4 befestigt sein, die eine Glasoberfläche, eine Kunststoffkugel (bead) oder ein Dielektrikum darstellt.

Die Erfindung, basiert auf den Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten in einer flüssigen Probe auf Veränderungen physikalisch-chemischer Eigenschaften des Sensors *per se*, ohne Markierung des Ziepeptides. Als Beispiel der experimentellen Verfahren zur Detektierung der Veränderungen des Dipolmoments des Sensors können die Messungen der Veränderungen der Dielektrizitätskonstante (Permittivität), Relaxationsströme, Brechzahl, Dichte, Intensität des polarisierten Lichtes, oder induzierte Fluoreszenz (Kindling) genannt werden.

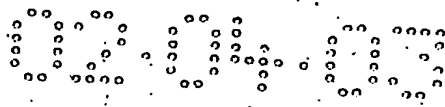
Tabelle 1 zeigt die Beispiele der designeden (designed) Sensoren zum Nachweis von Protein Kinase C (PKC) und Protein Kinase A (PKA) und Phosphatasen Aktivitäten. Die Beispiele sind illustrativ, nicht restriktiv.

Tabelle1 (Fett zeigt Modifikationsreste(n) X)

Moiety 1	Recognition Site	Moiety 2	Aktivität	Nr.
EPEAVA EHG	DKKS	KKAKKER	Protein Kinase C	1
EPEAVA EHG	RRAS	KKAKKER	Protein Kinase A	2
DLDVPI GRFD	RRVS	VAAD	Protein kinase A	3
DLDVPI GRFD	RRV pS	VAAD	Protein phosphatase 2B	4
E	IpYETD pYpY	D	Tyrosine Phosphatase	5

Lichtintensität Messungen

$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \quad (1)$$
$$\bar{\mu}_E/\mu = \mu E/3kT \quad (2)$$
$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \sim N = \overline{\mu_E / \mu} = \mu E / 3kT \quad (3)$$



8

Ändert sich das Molekularpolmoment als Resultat einer postrationalen Aktivität, führt es zu Veränderungen der detektierten Lichtintensität.

Messungen der Permittivität

In andere Variante zum Nachweis der postrationalen Aktivitäten, wird die Dielektrizitätskonstante (Permittivität) einer flüssigen Probe mit Sensor gemessen. Wie in Abb.2, befindet sich die Probe in einer Messzelle M, die als Kondensator dient. Durch Einbringen eines polarisierenden Dielektrikums zwischen den Platten eines Kondensators, wird die elektrische Feldstärke im Vakuum E_0 auf P/ϵ_0 reduziert:

$$E = E_0 - P/\epsilon_0 \quad (4)$$

wobei $E_0 = E/\epsilon$, und P – ist induzierte Polarisation des Dielektrikums mit einer Dielektrizitätskonstante ϵ .

Das ergibt:

$$\epsilon = \epsilon_0 + P/E \quad (5)$$

Da Polarisation die Bedeutung eines Dipolmoments pro Volumeneinheit hat, ist P somit proportional dem scheinbaren mittleren Dipolmoment μ_E , der nach Gleichung (2) ist $\overline{\mu_E} = \mu^2 E / 3kT$, das ergibt für ϵ :

$$\epsilon = \epsilon_0 + \mu^2 / kT, \quad (6)$$

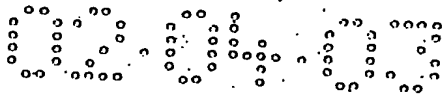
Wird ein Dipolmoment aufgrund einer postrationalen Modifikation geändert, führt es zu Veränderungen der Dielektrizitätskonstante nach Gleichung (6).

Werden die Sensormoleküle (s) in Wasser (w) oder anderen Lösungsmittel gelöst, muß die Mollpolarisation von diesen berücksichtigt werden:

$$P = P_w x_w + P_s x_s, \quad (7)$$

wobei x_s ist Molenbruch von Sensor $x_s = n_s / (n_w + n_s)$, und x_w ist Molenbruch von Wasser $x_w = n_w / (n_w + n_s)$.

Abb. 3 zeigt ein Beispiel der Veränderungen Dielektrizitätskonstante für zwei synthetisierten Modelpeptiden (3) und (4) Tabelle 1. Die in Wasser gelöste Polypeptide (3) oder (4) sind als Dielektrikum zwischen Elektrodenplatten der Messzelle M (Abb. 2) angebracht. Polypeptid (3) DLDVPIGRFDRRVS₁₃VAAD ist ein spezifisches Substrat für Protein Kinase A, die



Phosphorylierung des Ser-13 katalysiert. Dephosphorylierung des Ser-13 des Polypeptids (4) DLDVPIGGRFDRRVpS₁₃VAAD erfolgt durch Phosphatase 2B. Dielektrizitätskonstante des unphosphorylierten Polypeptids (3) ϵ_3 beträgt 76, wobei diese des phosphorylierten Polypeptids (ϵ_4) auf 70 reduziert. Somit ermöglichen diese Verfahren die Aktivitäten dieser Enzyme nachzuweisen.

In andere Variante der Verfahren zum Nachweis des posttranslationalen Aktivitäts, sind die in Wasser gelöste Polypeptide (3) oder (4) als Substrate in einer Messzelle angebracht, die Induktivität L und Kapazität C besitzt und als Oszillator dient (Abb. 4). Die Frequenz ω des Oszillators lässt sich durch $\omega = 1/LC$ bestimmen, die mit hoher Genauigkeit (10^{-5}) gemessen sein kann. Es ist eine deutliche Verminderung der Frequenz zu sehen, wenn die Probe anstatt unphosphorylierten ein phosphorylierten Polypeptid beinhaltet (Abb. 4).

Messungen des Brechungsindex

Nach der Maxwell'schen Theorie des Magnetismus, besteht zwischen der Dielektrizitätszahl und bei gleicher Frequenz gemessenen Brechungsindex n die Beziehung: $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0 = n^2$. Das ermöglicht die durch posttranslationalen Aktivität induzierte Veränderungen des molekularen Dipolmoments durch Veränderungen des Brechungsindex:

$$n = (1 + \mu^2/kT\epsilon_0)^{1/2} \quad (8)$$

zu detektieren.

Da die flüssigen Proben aus den Zellen oder Organismus sehr kompliziert sind und viele Proteine und kleinere polarisierenden Molekülen besitzen, führt es zur großen Variabilität der o.g. physikalischen-chemischen Eigenschaften solcher Proben. Um posttranslationalen Aktivität in komplizierten flüssigen Proben nachzuweisen, wichtig ist differenzielle Messungen durchzuführen. Dielektrizitätskonstante, Brechungsindex, oder Lichtintensität, können z.B. als Differenz zwischen Proben mit und ohne Sensors oder vor und nach eine Inkubierung mit Sensor detektiert sein. Z.B. können die kleinen flüssigen Proben mit Sensor in einem Bio-Chip verwendet sein (DE 100 51 252 A1), das durch differenzierte Kapazitätsmessungen einer Meßzelle und eines Referenzkondensators die Genauigkeit von 0.1% bietet.

Referenzen:

1. Brandt, W., Anders, A., and Vasilets, L.A. (2002) Predicted alterations in tertiary structure of the N terminus of the Na^+/K^+ -ATPase α subunit caused by acidic replacement or PKC-mediated phosphorylation of Ser-23. Cell. Biochem. Biophys. 37:83-95.
2. US 6,410,255
3. DE 100 51 252 A1

Unterschriften zu den Abbildungen.

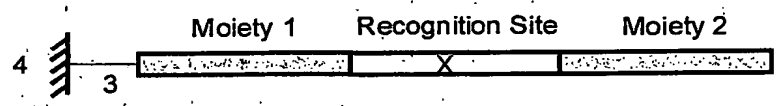
Abb. 1 Schematische Darstellung (A) eines elektrostatischen Sensors, (B) Veränderungen des Dipolmoments μ als Folge einer Modifizierung der Zielreste X durch posttranslationalen Aktivität in der Probe.

Abb. 2 Schematische Darstellung zum Nachweis der posttranslationalen Aktivität mit Hilfe optischen Messungen. L – Lichtquelle, P Polarisator, M – Meßzelle mit einer flüssigen Probe mit dem Sensor, A – Lichtanalysator, D – Lichtdetektor.

Abb. 3. Nachweis der Peptidmodifizierung durch die Messungen der relativen Dielektrizitätskonstante ϵ . Vier μl von Proben mit jeweils Polypeptid DLDVPIP-GRFDRRVSAAD (unphosphorilliert) oder DLDVPIPGRFDRRVpSVAAD (phosphorilliert) (3 und 4, Tabelle 1), die in H_2O in Konzentration 1.14 mM gelöst sind, sind unmittelbar zwischen Elektrodenplatten eines Messkondensators eingetragen. Die Messungen der Dielektrizitätskonstante ϵ erfolgen bei Temperatur $t=23^\circ\text{C}$.

Abb. 4 Nachweis der Peptidmodifizierung durch Messungen der Frequenzverschiebung eines Oszillators. Ein Röhrchen mit 150 μl von Proben mit unphosphorillierten Peptid 3 oder phosphorillierten Peptid 4 (Konzentration 1.14 mM in H_2O) ist als Kern in einer Induktionsspule eines Oszillators plziert. Frequenz f ist bei Temperatur $t = 22^\circ\text{C}$ gemessen, $f_0 = 5342.9 \text{ kHz}$.

A



B

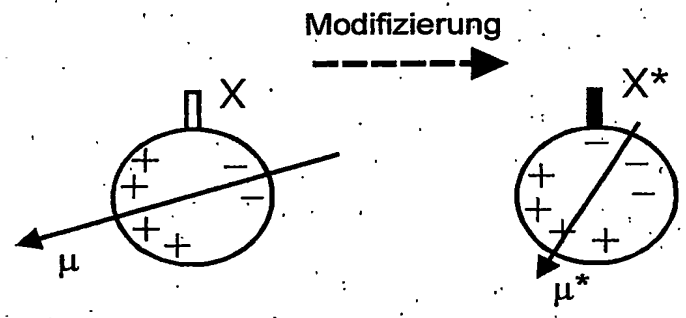


Abbildung 1

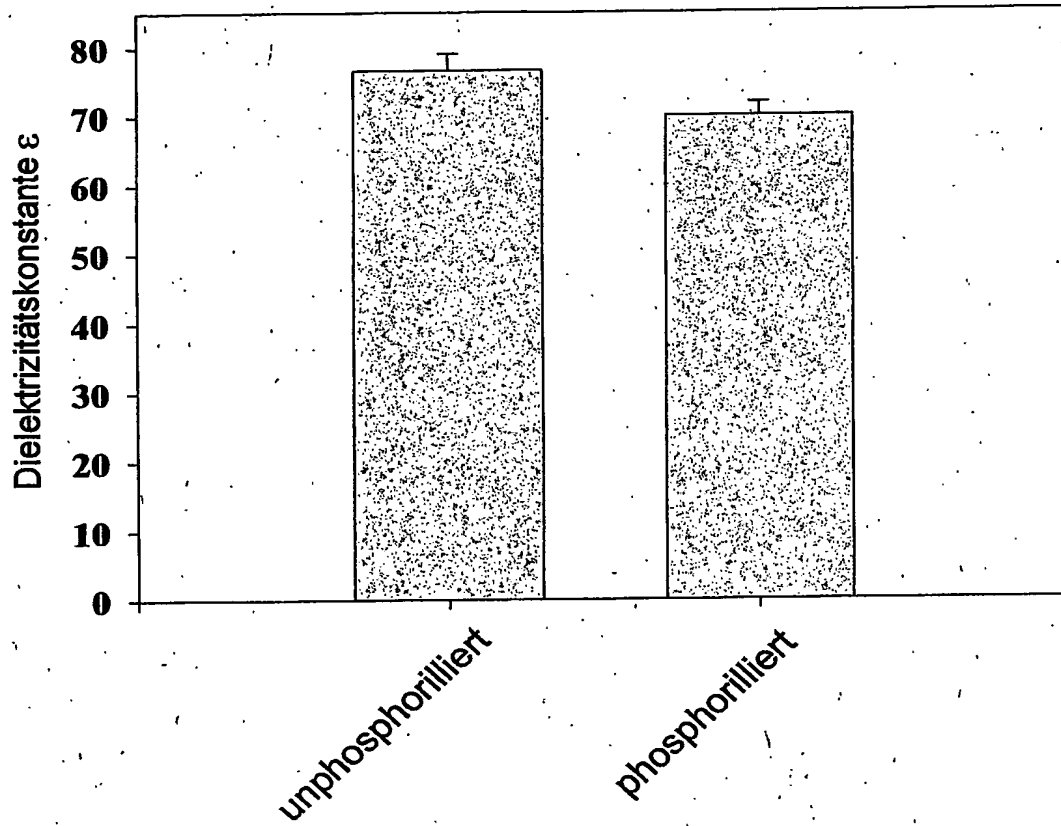


Abbildung 3

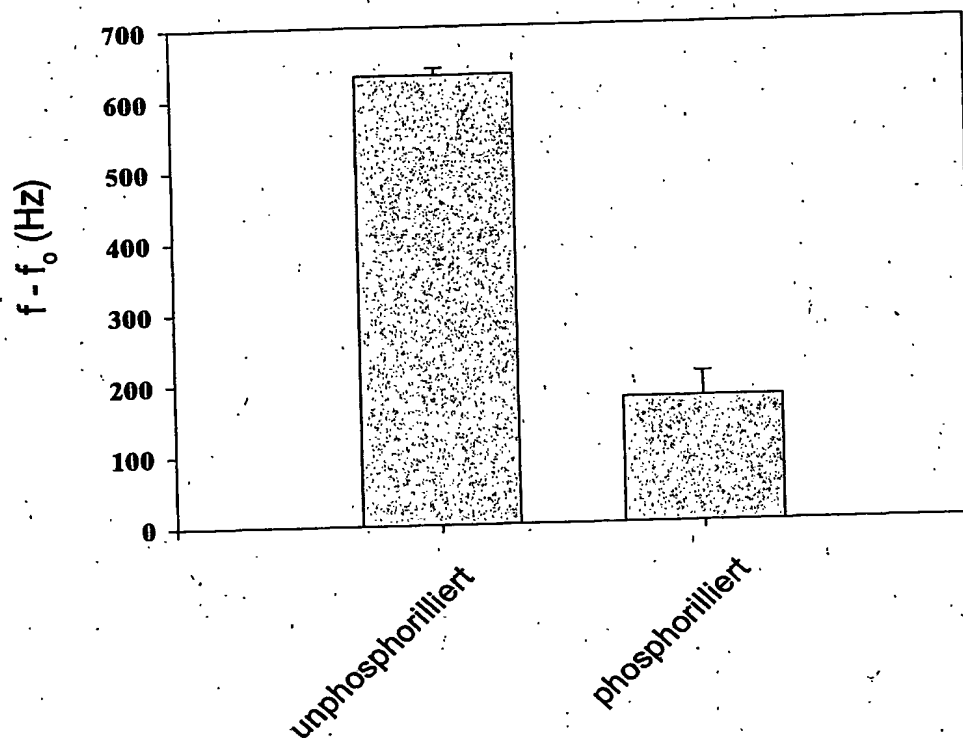


Abbildung 4